

MARITA MACIEL MOREIRA BLASKOWSKI

DOSAGENS MICROBIOLÓGICAS DE VITAMINAS  
EM FARINHAS DE MILHO E MANDIOCA

Tese apresentada ao Instituto de  
Bioquímica da U. F. Pr., visando  
a obtenção do Grau de Mestre em  
Bioquímica - Trabalho realizado  
sob a orientação da Dra. Elma N.  
S. de Oliveira.

INSTITUTO DE BIOQUÍMICA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

1972

Aos meus pais, ao meu marido  
e à minha filha, cujas exis-  
tências dão sentido a tudo  
que eu possa realizar.

... "In short, it is important to find out what other men have learned, to repeat their experiences and experiments, so that you too may observe what happens and, having absorbed the "experience of the race", may then attempt to go beyond" (41).

## I -- INTRODUÇÃO

A citação da mandioca como planta nativa do Brasil, data da época do descobrimento quando os portugueses descreveram uma raiz que se assemelhava ao inhame de São Tomé. Segundo Cascudo (14), coube a Pero de Magalhães Gandavo e Gabriel Soares de Souza, esclarecer a semelhança pela comparação dos dois tipos. Os europeus aqui radicados ampliaram e melhoraram o seu plantio e cultivo (as "casas de farinha") , bem como o seu consumo.

O milho, oriundo da América Central, onde seu cultivo foi iniciado há milênios, pelas antigas civilizações pré-colombianas é, hoje, sem dúvida nenhuma, considerado como uma grande contribuição no campo dos recursos alimentares legada pelo continente americano ao mundo e à civilização, sendo utilizado na alimentação dos povos de todos os continentes (15). Estudos feitos na população de Minas Gerais, em 1817 e registrados por Cascudo (14), mencionam o seu consumo sob a forma de fubá cozido na água, sem acrescentar sal (angu), constituindo o principal alimento dos escravos. Em São Paulo, utilizavam-no sob a forma de farinha (14). Ainda hoje, o emprego das farinhas de milho ou mandioca, é um hábito generalizado entre nós. Castro (16) e Paula (44) apresentam, em seus estudos, o Brasil dividido em áreas alimentares, mencionando em todas elas o uso das farinhas de milho ou mandioca. Lobato (34), baseando-se em classificações e trabalhos técnicos apresentados anteriormente, traça um panorama geral dos hábitos e costumes da alimentação brasi-

leira. Devido à nossa grande área geográfica, às variações climáticas e influência dos diversos grupos colonizadores, não existe no Brasil um padrão alimentar único. "No entanto, existem alguns alimentos considerados básicos que aparecem sempre, ora predominantes, ora em menores quantidades, na alimentação de todos os grupos populacionais brasileiros" (34). As farinhas de milho e mandioca estão incluídas entre os alimentos considerados básicos na alimentação de vários de nossos grupos populacionais, sendo a mandioca mais empregada nos Estados do Norte e a de milho nos Estados do Sul. Provavelmente, este uso tão generalizado de alimentos de comprovada pobreza protéica (10, 15) na dieta diária de muitos de nossos grupos populacionais, faça estudiosos do assunto referirem-se à nossa alimentação como precária e inadequada (16, 44). Citando Paula (44) : "Não sabemos como nos alimentamos nem de que nos alimentamos. O instinto e o alimento ao nosso alcance, tem sido os nossos guias". Analisando as várias áreas alimentares de nosso país, sempre se encontrou ao lado das classes abastadas e bem alimentadas, uma grande maioria de grupos populacionais sem uma dieta equilibrada e balanceada. Às vezes predominando o consumo de alimentos ricos em carboidratos, outras em lipídeos, mas quase sempre com uma quota não equilibrada de proteínas e vitaminas. Realizando suas pesquisas de Norte a Sul, Paula (44), pode constatar em toda nossa extensão geográfica a presença de uma classe com fome quantitativa e com várias nuances da subnutrição representadas por indivíduos portadores de preguiça crônica, indolência, inatividade, pe

queno porte, retardo mental, edema protêico, cárie dentária e ainda verminoses e bócio endêmico.

Segundo Pernetta (45), podemos mencionar como doenças de carência a avitaminose A, o Beriberi, o Escorbuto, o Raquitismo, a distrofia do lactante e a Pelagra infantil. A Pelagra infantil (45) ou "distrofia pluricarencial hidropigênica" (11, 12), foi observada em 1935 por Williams (59), com a denominação de "Kwashiorkor", como é conhecida pela maioria dos autores estrangeiros (6, 9, 22, 38, 51, 55). Em 1952 foi denominada por Brock (9), como "distrofia farinácea".

Entre nós, Marques e Balassiano (36), constataram a distrofia pluricarencial hidropigênica em crianças, sendo evidenciada em adultos por Fraga (20) e Porto (48).

Carência vitamínica associada à deficiência proteica em casos de subnutrição tem sido largamente registrada pela literatura especializada (23, 55, 56, 57, 58).

Considerando-se a importância bioquímica das vitaminas em seu papel metabólico de constituinte de coenzimas, (17, 18, 28, 35, 49, 52, 53), as quais associadas à apoenzima, formam o complexo catalítico ativo - a holoenzima que interfere em todas as reações bioquímicas do organismo, e sabendo-se que a falta de um suprimento quantitativamente adequado de vitaminas na dieta diária, pode acarretar alterações graves em sistemas enzimáticos envolvidos com o metabolismo intermediário, acreditamos que haja uma estreita relação entre os quadros de distrofia nutricional e a pobreza vitamínica de um dos alimentos considerados básicos na alimentação.

tação de nossos grupos populacionais - as farinhas de milho, consumida na região centro-sul e a de mandioca mais empregada na região norte-nordeste e litoral-sul.

Internacionalmente a determinação de vitaminas em alimentos tem sido bastante explorada (54), tendo-se em vista que "o conhecimento do valor vitamínico dos alimentos é de fundamental importância para qualquer planejamento que visa contribuir para a melhoria da alimentação dos povos" (50).

Num país como o nosso, onde o problema alimentar se mostra bastante grave, desde 1935 já se começou a abordar o tema do teor de vitaminas em alimentos caracteristicamente brasileiros com os trabalhos pioneiros de Campos (10), Graner et al (25), que aferiram biologicamente a presença do complexo B em mandioca. Guernelli (27) constatou a presença de vitamina B<sub>1</sub> e niacina em farinha de mandioca torrada. Posteriormente foi explorada a presença de ácido nicotínico em café por Carvalho (13), Araújo et al (3) e Oliveira et al (42) e mais recentemente Ribeiro (50), que se preocupou com o teor vitamínico em peixes e crustáceos de maior consumo pela população brasileira.

Apesar da presença de vitaminas em cereais - ceter bem documentada (54), consultada a literatura especializada, verificou-se que a ocorrência de vitaminas em farinhas, ou seja, derivados de cereais está restrita a duas coletâneas sobre o valor vitamínico de uma série de alimentos (21,1), sendo uma mais relacionada à nutrição humana e outra à nutrição animal. Enquadram-se no mesmo tema os trabalhos de

Guernelli (27) e uma revisão feita por Meder e Wiss (37).

Efetuamos dosagem microbiológica de ácido nicotínico, piridoxina e ácido pantotênico em farinhas de milho e mandioca de diversas regiões do Brasil. Outrossim o método empregado (60), para dosagem do ácido nicotínico, em determinadas condições, dosa-se também trigonelina. A transformação da trigonelina em ácido nicotínico foi mencionada por Graviotto et al (26) e comprovada experimentalmente por Barbiroli (7), Hugles & Smith (29). Os primeiros estudos demonstrando a presença de trigonelina em produtos naturais foram realizados por Polstorff et al (47) e Gorter (24) em amostras de café. Posteriormente, Moores & Greninger (39) e Barbiroli (7), também realizaram pesquisas sobre o teor de trigonelina em café e mais recentemente, Oliveira, Campos e Kizawa (43), aferiram o teor de trigonelina em cafés brasileiros. Beers (8), detectou trigonelina em produtos do mar. Ribeiro (50), estudando o teor de vitaminas em peixes e crustáceos, admite que o elevado teor de ácido nicotínico encontrado em uma amostra de camarão Sete barbas, cozido, deve-se presumivelmente, à trigonelina. O mecanismo desta demetilação ainda é desconhecido.

As propriedades fisiológicas da trigonelina ainda não estão bem evidenciadas, contudo a sua incapacidade em atuar como fator antipelagroso em animais, foi comprovada por alguns pesquisadores (33, 40). A possibilidade de que a trigonelina tivesse alguma ação preventiva na infiltração gordurosa no fígado e formação de rins hemorrágicos em ratos, foi contestada por Moyer e Du-Vigaud (40). Em humanos



verificou-se que a administração oral de trigonelina não era seguida por significativo aumento de ácido nicotínico na excreção urinária (19). O metabolismo da trigonelina em levedura (Torula cremoris) em brotos de ervilha foi estudado por Joshi e Handler (31), que relataram o seu relacionamento com a biossíntese da NAD e NADP. Admitiram que no caso das leveduras, poderia ocorrer uma demetilação oxidativa, enquanto que nos brotos de ervilha o mecanismo dessa demetilação ainda é desconhecido.

Biologicamente, objetivamos no presente trabalho a determinação qualitativa e quantitativa de vitaminas em um dos alimentos considerados básicos para certos grupos populacionais brasileiros, enquanto que humanisticamente, esperamos, possa ele ser útil nos setores de nutrição, quando do planejamento de programas de suplementação alimentar às populações menos favorecidas.

## II - MATERIAL E MÉTODOS

PROCEDÊNCIA DAS AMOSTRAS: - Foram utilizadas na realização deste trabalho 14 (catorze) amostras de farinha de mandioca e 8 (oito) de farinha de milho, sendo duas amostras de milho branco e seis de milho amarelo procedentes de vários Estados de nosso país.

### a) Amostras de farinha de mandioca

Nº de amostras:

Rio Grande do Sul.....	1
Santa Catarina.....	3
São Paulo.....	1
Minas Gerais.....	2
Rio de Janeiro.....	2
Bahia.....	1
Piauí.....	1
Rio Grande do Norte.....	1
Ceará.....	1
Pará.....	1
TOTAL.....	14

### b) Amostras de farinha de milho

Nº de amostras:

Santa Catarina.....	1
Paraná.....	4
São Paulo.....	2
Minas Gerais.....	1
TOTAL.....	8

O material analisado (farinha de milho, devido à presença de bijus e a amostra de farinha de mandioca do Pará, devido à presença de granulações grosseiras) foi triturado em gral até a obtenção de um pó o mais homogêneo possível.

#### Procedência das drogas:

- Baker's Chemical Company..... Baker.
- Baltimore Biological Laboratory..... B. B. L.
- Carlo Erba..... C. E.
- Difco Laboratories..... Difco
- E. Merck Ag. Darmstad..... Merck
- Mann Research Laboratories..... Mann
- Nutricional Biochemicals Corporation Chemical Company..... N. B. C.
- Oxoid..... Oxoid
- Pfanstiehl Laboratories..... P. L.
- Riedel - De Haën Ag. - Hannover..... Riedel.

Água bidestilada: Utilizamos água bidestilada pelo bidestilador "Corning" modelo Ag. - 10 a.

Preservação das soluções: Todas as soluções e meios de cultura, quando não utilizados imediatamente, foram conservados em frascos de vidro com rolha esmerilhada, adicionados de preservativos voláteis (Clorofórmio e Tolueno).

Estimativa do Crescimento: A intensidade do crescimento foi aferida por turbidimetria, utilizando-se fotocolôrimetro Klett-Summerson com filtro verde (540 m $\mu$ ) e os resultados expressos em unidades Klett.

Meio Básico: O meio básico previamente preparado em dupla concentração, foi conservado em geladeira. A posterior autoclavação do meio a  $121^{\circ}$  durante 30 minutos, eliminava a interferência dos preservativos.

Preparação do inóculo: Para o inóculo foram usadas culturas de 24 horas de idade, semeadas no meio usado para a cultura de manutenção e incubadas a  $37^{\circ}$ . A suspensão foi preparada tocando-se de leve a cultura com agulha de platina, esterilizada diretamente na chama e transferindo-se pequena porção (massa de organismo que cobrisse apenas 1 a 2 mm da extensão da agulha de platina) para um Erlenmeyer, contendo 5 ml do meio básico e 5 ml de água bidestilada. Para inoculação foi usada uma gota dessa suspensão, semeada com pipeta Pasteur.

#### DOSAGEM MICROBIOLÓGICA DO ÁCIDO NICOTÍNICO

1) Organismo: Torula cremoris 2897 (Candida pseudotropicalis)

2) Meio de manutenção: Ágar Sabouraud

Glicose anidra.....	(Baker).....	2,0 g%
Peptona.....	(Difco).....	1,0 g%
Extrato de levedura.....	(Oxoid).....	1,5 g%
Ágar.....	(Oxoid).....	1,5 g%
pH.....		6.0 - 5.5

A distribuição foi feita, colocando-se 5 ml do meio em tubos 18 X 180 mm fechados com tampões de algodão hidró-

filo, autoclavados a  $121^{\circ}$ , durante 30 minutos e inclinados. As culturas semeadas foram incubadas a  $37^{\circ}$  por 24 horas e conservadas em geladeira. As amostras eram repicadas em períodos não superiores a um mês.

### 3) Meio básico: Segundo Williams (60):

Glicose anidra.....(Riedel)... 5,0 g%  
 Fosfato Monopotássico anidro ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )...(Merck)... 0,03g%  
 \* Peptona tratada por carvão.....(Difco)... 1,0 g%  
 \*\* Citrato de potássio (tampão).....(Baker)... 5,0 ml/100 ml  
 Biotina.....(N.B.C.)... 2,5 µg%  
 Cloridrato de tiamina.....(Merck)... 250,0 µg%  
 Cloridrato de Piridoxina.....(Merck)... 250,0 µg%  
 Pantotenato de cálcio.....(Merck)... 250,0 µg%  
 Inositol.....(P.L.)... 2,5 mg%  
 Sulfato de magnésio.....(Merck)... 0,01 g%  
 pH..... 5.0

\* Peptona tratada por carvão segundo Isbell (30)

\*\* Preparo da solução tampão:

Citrato de potássio  $[\text{HOOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOK})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}]$  (Merck) 100 g  
 Ácido cítrico.....(Merck) 20 g  
 Completar para 1000 ml com água bidestilada.  
 pH..... 5.7

### 4) Preparo das amostras:

4.1) Doseamento do ácido nicotínico total: (Extratos hidrolizados) -- 1,0 g de cada amostra finamente triturado foi colocado em um Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de

NaOH 3 N e autoclavado a  $121^{\circ}$  por 60 minutos. O hidrolizado foi a seguir neutralizado com  $H_2SO_4$  2N e filtrado em várias camadas de gaze superpostas, previamente umedecidas com água bidestilada até que o volume de 100 ml fosse completado. Usou-se nos doseamentos volumes do filtrado direto cujas concentrações fossem correspondentes à faixa de proporcionalidade da curva padrão.

#### 4.2) Doseamento do ácido nicotínico livre: (Soluções aquosas)

a) Amostras de farinha de mandioca: - 0,5g de cada amostra foi colocada em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 80 ml de água bidestilada. Após ter sido deixada em agitação por 60 minutos, foi filtrada em papel de filtro comum e o volume completado para 100 ml com água bidestilada. Usou-se nos doseamentos volumes do filtrado direto, cujas concentrações correspondessem à faixa de proporcionalidade da curva padrão.

b) Amostras de farinha de milho: - 4 g de cada amostra de farinha de milho finamente trituradas, foram colocadas em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 80 ml de água bidestilada, seguindo-se a mesma técnica descrita acima para as soluções aquosas de farinhas de mandioca.

5) Solução padrão: A solução padrão do ácido nicotínico foi preparada e guardada em refrigerador numa concentração de 1 miligrama por mililitro, sendo diluída nas concentrações exigidas para a curva padrão, no momento de usar, de modo que ficasse reduzida à concentração de  $0,10 \mu g$  de vitamina por mililitro. Na preparação das curvas padrões fo-

ram usadas quantidades conhecidas dessa solução, recentemente preparada, adicionadas a 5 ml do meio básico duas vezes concentrado, completando-se para 10 ml o volume final.

6) Curva padrão: Para montagem da curva padrão foram utilizadas as seguintes concentrações de ácido nicotínico por Erlenmeyer: 0,0; 0,05; 0,10; 0,15; 0,20; 0,25; 0,30 µg.

7) Esterilização: 30 minutos a 121°.

8) Condições de incubação: Os doseamentos foram efetuados em Erlenmeyer de 50 ml com volume final de 10 ml, sendo os mesmos incubados a 37°, cultura estacionária, por 24 horas.

#### DOSAGEM MICROBIOLÓGICA DA PIRIDOXINA

1) Organismo: Saccharomyces carlsbergensis ATCC "9080".

2) Meio de manutenção: Ágar Sabouraud inclinado.

3) Meio básico: Segundo Atkim et al (4) modificado por Pinheiro (46).

Solução de açúcar e sais.....	2,5	ml%
* Solução tampão.....	0,5	ml%
** Peptona tratada por carvão (10%) (B.B.L.).....	1,0	ml%
Cloridrato de tiamina..... (Merck).....	2,5	µg%
Inositol..... (P.L.).....	0,25	mg%

Biotina.....(M.B.C.).. 0,08 µg%  
 \* Ácido nicotínico.....(Merck)... 0,25 mg%  
 Ácido pantotênico (ou pantotenato de Ca)(Merck)...25,0 µg%  
 Completar o volume com água bidestilada.

\* Preparo da solução tampão: O mesmo descrito para o ácido nicotínico.

\*\* Peptona tratada por carvão segundo Isbell (30).

Preparo da solução de açúcar e sais:

Glicose.....	(Riedel).....	200,00 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	(Baker).....	2,20 g
KCl.....	(Merck).....	1,70 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ .....	(Merck).....	0,50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .....	(Merck).....	1,023 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .....	( - ).....	0,015 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....	(C.E.).....	0,012 g
$\text{H}_2\text{O}$ bidestilada.....	( - ).....	1000 ml

#### 4) Preparo das amostras:

a) Doseamento da Piridoxina total -- (Extratos hidrolizados)  
 -- 0,5 g de cada amostra finamente triturada, foi colocada em um Erlenmeyer de 250 ml, contendo 18 ml de HCl 1 N e auto --  
 clavada a 121° por 60 minutos. O pH foi ajustado a 5,0 com NaOH a 30% e o hidrolizado filtrado em papel de filtro co--  
 mum. O precipitado foi lavado com água bidestilada e o volu--  
 me completado para 100 ml. Os doseamentos foram efetuados



com volumes do filtrado direto, cujas concentrações correspondessem à faixa de proporcionalidade da curva padrão.

b) Doseamento da Piridoxina livre (soluções aquosas) -- 1g de cada amostra finamente triturada, foi colocada em Erlenmeyer de 250 ml, contendo 80 ml de água bidestilada. Após tersido deixada em agitação por 60 minutos, foi filtrada em papel de filtro comum e o volume completado para 100 ml com água bidestilada. Os doseamentos foram efetuados com volume do filtrado direto, cujas concentrações correspondessem à faixa de proporcionalidade da curva padrão.

5) Solução padrão: A solução padrão da piridoxina (na forma de Cloridrato de Piridoxina) foi preparada e guardada em refrigerador na concentração de 10 microgramas por mililitro, sendo diluída nas concentrações exigidas para a curva padrão, no momento de usar, de modo que ficasse reduzida à concentração de 10  $\mu\text{g}$  por mililitro.

Na preparação das curvas padrões foram usadas quantidades conhecidas dessa solução adicionada a 5 ml do meio básico duas vezes concentrado, completando-se para 10 ml o volume final.

6) Curva padrão: Para a montagem da curva foram utilizadas as seguintes concentrações de piridoxina por Erlenmeyer: 0,0; 5; 10; 20; 30; 40 e 50  $\mu\text{g}$

7) Esterilização: Vapor fluente durante 10 minutos.

8) Condições de incubação: Os doseamentos foram efetuados em Erlenmeyers de 50 ml com volumes finais de 10 ml, sendo os mesmos incubados a 28<sup>o</sup>, cultura estacionária, por 24 horas.

#### DOSAGENS MICROBIOLÓGICAS DO ÁCIDO PANTOTÊNICO

1) Organismo: Saccharomyces carlsbergensis -- ATCC "9080".

2) Meio de manutenção: Ágar Sabouraud inclinado.

3) Meio básico: segundo Atkin et al (5)

A) Solução de açúcar e sais.....	500	ml
B) Tampão citrato de potássio.....	100	ml
C) Solução de vitaminas.....	10	ml
D) Solução de asparagina.....	3,75	g
E) Sulfato de amônio.....	7,5	g
F) H <sub>2</sub> O bidestilada até completar 1.000 ml		

Não é necessário ajustar o pH

#### Preparo das soluções:

A) Solução de açúcar e sais:

Glicose.....	(Riedel).....	200,0	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	(Baker).....	2,2	g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O.....	(Merck).....	0,5	g

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....(Merck)..... 0,5 g  
 $\text{MnSO}_4$ .....(C.E.)..... 0,01 g  
 $\text{FeCl}_3$ .....( - )..... 0,01 g  
 Completar o volume para 1 000 ml com água bidestilada.  
 Não é necessário ajustar o pH.

#### B) Solução de vitaminas

Tiamina HCl.....(Merck)..... 50 mg  
 Piridoxina HCl.....(Merck)..... 50 mg  
 Biotina.....(N.B.C.)..... 4 mg  
 Inositol.....(P.L.)..... 5 mg  
 Completar para 1 000 ml com água bidestilada.

C) L - Asparagina..... 3,75 g

(Segundo o método, pode-se, também empregar 125 ml de uma  
 solução a 30 ‰ para cada litro de meio básico de dupla con-  
 centração (2 X).

4) Doseamento do ácido pantotênico total (preparo  
 das amostras) 2 g de cada amostra finamente triturada foram  
 colocadas em Erlenmeyers de 250 ml com água bidestilada. O  
 precipitado foi lavado com água bidestilada até que se comple-  
 tasse o volume de 100 ml. Usou-se nos doseamentos volumes do  
 filtrado direto cujas concentrações correspondessem à faixa  
 de proporcionalidade da curva padrão.

5) Preparo da solução padrão: em um balão volumétrico  
 de 1 000 ml contendo 500 ml de água bidestilada, foram

dissolvidos 54 mg de Pantotenato de Cálcio (ou 50 mg de Ácido pantotênico), previamente secos 2 horas a  $105^{\circ}$ . O volume foi completado com água bidestilada. No momento de usar a solução padrão (1 ml = 50  $\mu$ g) foi diluída do seguinte modo:

A) 0,5 ml em 500 ml de água bidestilada (1 ml = 50  $\mu$ g)

B) 1 ml em 250 ml de água bidestilada (1 ml = 200  $\mu$ g).

6) Curva padrão: Para a montagem da curva padrão foram utilizadas as seguintes concentrações de ácido pantotênico por Erlenmeyer 0,0; 50; 100; 150; 300 e 400  $\mu$ g.

7) Esterilização: Vapor fluente durante 10 minutos.

8) Condições de incubação: Os doseamentos foram efetuados em Erlenmeyers de 50 ml, com volumes finais de 10 ml, sendo os mesmos incubados a  $28^{\circ}$ , cultura estacionária, por 24 horas.

### III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados expostos para todas as determinações representam pelo menos três dosagens concordantes, correspondendo a cada dosagem o valor médio de cinco determinações em duplicatas, expressas em mg de vitaminas por 100 g de material analisado.

#### ÁCIDO NICOTÍNICO E TRIGONELINA

Na tabela I, encontram-se registrados os teores de ácido nicotínico em catorze amostras de farinha de mandioca, podendo-se observar, que foram obtidos para o ácido nicotínico total, valores oscilando entre 0,41 e 0,69 mg com um valor médio de 0,49 mg, correspondendo o valor mínimo às amostras de Santa Catarina e Pará e o valor máximo a uma das amostras de Minas Gerais e Rio de Janeiro.

Segundo o método empregado (60) a dosagem do ácido nicotínico em solução aquosa nos dá os teores de ácido nicotínico livre e trigonelina. Por subtração do valor real obtido para ácido nicotínico, obtem-se o valor correspondente à trigonelina presente numa proporção de 91,5% do valor real. Conseqüentemente estes valores foram submetidos a um fator de correção, dando o valor da trigonelina presente no material analisado.

Conforme se verifica na Tabela I, o valor mínimo para a trigonelina, foi 0,86 mg encontrado na amostra do

Piauí e o valor máximo de 7,35 mg, verificado na amostra do Ceará, com valor médio de 2,50 mg.

Na tabela II estão expostos os resultados referentes aos teores de ácido nicotínico obtidos no doseamento de amostras de farinha de milho os quais variaram para o ácido nicotínico livre entre um mínimo de 0,17 mg, encontrado em uma das amostras do Paraná, e um máximo de 0,57 mg, obtido na amostra de Minas Gerais, com um valor médio de 0,32 mg, enquanto que no que se refere ao ácido nicotínico total os resultados apresentaram-se entre um mínimo de 0,20 mg. em uma das amostras do Paraná, e um máximo de 1,00 mg obtido na amostra de Santa Catarina, com um valor médio de 0,64 mg. Não se detectou trigonelina em farinha de milho.

A composição centesimal de ácido nicotínico mencionada na literatura especializada (21), aponta um teor de 0,478 mg para a farinha de mandioca, estando, conseqüentemente, equivalente aos teores por nós obtidos, ou seja, 0,490 mg. Em se tratando de milho, os nossos dados estão ligeiramente acima do valor mínimo registrado por Franco (21), que cita em sua coletânea de dados sobre teores vitamínicos dos alimentos, valores entre 0,540 mg. Já Andriguetto et al (1) referem para a farinha de milho, 48,4 g/kg (4,84 mg%), teor superior ao encontrado por nós. Provavelmente, esta diferença seja devida a que se tenha usado naquele doseamento a farinha de glúten de milho.

Com a finalidade de comprovar a pobreza, em ácido ni

cotínico das farinhas estudadas, a Tabela III expõe teores desta vitamina em outros alimentos, referidos na bibliografia consultada.

A análise estatística comparativa entre os teores de ácido nicotínico total encontrados em farinhas de mandioca e milho, foi feita, aplicando-se o Teste "t" às médias obtidas. (Quando havia mais de uma amostra representativa do mesmo Estado, foi calculada previamente uma média parcial com os dados encontrados referentes àquela região). As médias para os diferentes teores foram:

1) Farinha de mandioca  $\bar{X} = 0,49 \pm 0,02$  mg/100 g

2) Farinha de milho  $\bar{X} = 0,64 \pm 0,13$  mg/100 g

$$t = \frac{0,49 - 0,64}{0,10} = -1,50$$

$$t_{(12)} \frac{5\%}{2} = 2,18$$

Verifica-se pelos resultados acima expostos, não haver diferença estatisticamente significativa ao nível de 5% de probabilidade para os teores de ácido nicotínico encontrados em farinhas de mandioca e milho.

## 2) PIRIDOXINA

Os teores de piridoxina, encontrados em farinhas de mandioca, estão contidos na Tabela IV. Para a piridoxina livre os teores oscilaram entre 0,03 mg, na amostra de São Paulo, e 0,09 mg nas amostras de Santa Catarina, com um valor médio de 0,06 mg. No que se refere ao doseamento da pi

ridoxina total, os resultados obtidos estiveram entre um mínimo de 0,09 mg, em uma das amostras do Rio de Janeiro, na amostra do Piauí, e um máximo de 0,32 mg, em uma das amostras de Santa Catarina, com um valor médio de 0,14 mg.

Os dados obtidos para a piridoxina livre, resultantes do doseamento das farinhas de milho, estão mencionados na Tabela V. Registrando-se valores entre 0,09 mg em uma das amostras de São Paulo, e 0,34 mg, na amostra de Minas Gerais, com um teor médio de 0,15 mg. Para a piridoxina total, os teores oscilaram entre um mínimo de 0,11 mg, em uma das amostras do Paraná, e um máximo de 0,36 mg em uma das amostras de São Paulo com um valor médio de 0,22 mg.

Meder e Wiss (37), revisando os teores de vitamina B<sub>6</sub>, contidos em cereais e produtos derivados, citam a farinha de milho com um teor percentual de 0,05 mg, sendo este resultado inferior ao encontrado no presente trabalho. Na literatura encontram-se os teores de vitamina B<sub>6</sub> contidos em outros alimentos, assim como: feijão macaçar (2), 0,55 mg; carne de porco (52), 0,68 mg; fígado de boi (52), 0,73 mg; sardinha (50), 1,45 mg; ovo e leite fresco (37), 0,68 e 0,41 mg% respectivamente, superiores àqueles por nós obtidos.

Segundo Robinson (52), as farinhas sempre encerram um teor menor de vitamina do que o grão integral, assemelando-se à distribuição da piridoxina no grão, à do ácido nicotínico, que no milho se encontra mais concentrado, na camada aleurona. Talvez, por esta razão, os teores de 0,50 mg



(52), 0,52 mg e 1,18 mg% (1), encontrados em milho, sejam superiores aos mencionados neste trabalho, que se referem à farinha.

A análise estatística comparativa entre os teores de piridoxina total encontrados em farinhas de mandioca e milho foi feita, aplicando-se o Teste "t" às médias obtidas.

As médias para os diferentes teores foram:

1) Farinha de mandioca  $\bar{X} = 0,14 \pm 0,02$  mg/100 g

2) Farinha de milho  $\bar{X} = 0,22 \pm 0,04$  mg/100 g

$$t = \frac{0,14 - 0,22}{0,05} = -1,60$$

$$t_{(12)} 5\% = 2,18$$

Verificou-se, pelos resultados acima expostos, não haver diferenças estatisticamente significativas ao nível de 5% de probabilidade, para os teores de piridoxina encontrados em farinhas de mandioca e de milho.

### 3) ÁCIDO PANTOTÊNICO

Os teores obtidos para o ácido pantotênico, contidos em farinhas de mandioca, encontram-se na Tabela VI. Registrou-se um mínimo de 0,19 mg para a amostra da Bahia e um teor máximo de 0,50 mg para a amostra de Minas Gerais, com um valor médio de 0,32 mg.

Não foi possível fazer-se uma análise estatística comparativa dos teores de ácido pantotênico contidos em fa-

rinhas de mandioca e milho, uma vez que, microbiologicamente não se detectou nenhum teor em farinha de milho, razão pela qual, calculou-se apenas a média com seu respectivo erro: Farinha de mandioca  $\bar{X} = 0,32 \pm 0,02$  mg/100 g.

Em revisão feita, discutida e analisada por Robinson (52) sobre a ocorrência do ácido pantotênico, em alimentos, é sugerida uma classificação destes em ricos, moderados e pobres. Os ricos seriam aqueles que apresentassem um teor acima de 2,5 mg (fígado, 2,5 - 60; gema de ovo, de 5,0 a 10,00 e brócoli, 4,6 mg); os moderados apresentariam teores entre 2,5 e 0,1 (farelo de trigo, 2,4; batatas, 0,65; nata de leite 0,21 - 0,43 e couve 0,26 - 0,36 mg), e os pobres com teores inferiores a 0,1 mg% (ervilhas enlatadas, passas, amêndoas). Os nossos dados classificam as farinhas de mandioca como alimentos moderados quanto à presença do Ácido pantotênico.

TABELA I: TEORES DE ÁCIDO NICOTÍNICO EM FARINHA DE MANDIOCA

PROCEDÊNCIA	ÁCIDO NICOTÍNICO E TRIGONELINA (mg/ 100 g)	ÁCIDO NICOTÍNICO (mg/100 g)	TRIGONELINA (mg/100 g)	
			VALOR OBTIDO	VALOR CORRIGIDO
Rio G.Sul	3,25	0,49	2,76	2,52
Sta. Catarina	1,84	0,65	1,19	1,08
Sta. Catarina	2,40	0,41	1,99	1,82
Sta. Catarina	5,77	0,53	5,24	4,78
São Paulo	1,69	0,48	1,21	1,10
Minas Gerais	1,67	0,56	1,11	1,01
Minas Gerais	5,55	0,69	4,86	4,44
Rio de Janeiro	4,29	0,69	3,60	3,29
Rio de Janeiro	5,11	0,54	4,57	4,18
Bahia	2,45	0,45	2,00	1,83
Piauí	1,43	0,49	0,94	0,86
Rio G. Norte	2,32	0,57	1,75	1,60
Ceará	8,65	0,61	8,04	7,35
Pará	2,13	0,41	1,72	1,57

TABELA II: TEORES DE ÁCIDO NICOTÍNICO EM FARINHA DE MILHO

PROCEDÊNCIA	ÁCIDO NICOTÍNICO LIVRE (mg/100g)	ÁCIDO NICOTÍNICO TOTAL (mg/100 g)
Santa Catarina	0,27	1,00
Paraná	0,17	0,71
Paraná	0,36	0,54
Paraná	0,31	0,36
Paraná *	0,20	0,20
São Paulo	0,29	0,40
São Paulo *	0,41	0,44
Minas Gerais	0,57	0,68

\* Amostras de milho branco

TABELA III: ESTUDO COMPARATIVO DOS TEORES DE ÁCIDO NICOTÍNICO EM ALIMENTOS

MATERIAL ANALISADO	TEORES DE ÁCIDO NICOTÍNICO (mg/100 g)	BIBLIOGRAFIA
Amendoim, farinha de torta de.....	17,34	Andriguetto et al(1)
Café maduro (não torrado).....	6,70	Oliveira et al (42)
Carne, farinha de	4,40	Andriguetto et al(1)
Ervilha	2,46	Kizawa (32)
Feijão mulatinho	2,43	Araújo et al (2)
Lentilha	1,78	Kizawa (32)
Mandioca, farinha de.....	* 0,49	* Presente trabalho
Milho, farinha de	**0,64	* Presente trabalho
Sardinella aurita (sardinha).....	11,17	Ribeiro (50)
Soja.....	1,85	Kizawa (32)
Trigo.....	4,07	Kizawa (32)

TABELA IV: TEORES DE PIRIDOXINA EM FARINHA DE MANDIOCA

PROCEDÊNCIA	PIRIDOXINA LIVRE (mg/ 100 g)	PIRIDOXINA TOTAL (mg/100 g)
Rio G.Sul	0,06	0,27
Sta. Catarina	0,09	0,32
Sta. Catarina	0,09	0,24
Sta. Catarina	0,05	0,16
São Paulo	0,03	0,13
Minas Gerais	0,07	0,15
Minas Gerais	0,07	0,14
Rio de Janeiro	0,06	0,09
Rio de Janeiro	0,06	0,10
Bahia	0,06	0,10
Piauí	0,04	0,09
Ceará	0,07	0,10
Rio G.Norte	0,04	0,16
Pará	0,04	0,11

TABELA V: TEORES DE PIRIDOXINA EM FARINHA DE MILHO

PROCEDÊNCIA	PIRIDOXINA LIVRE (mg/100 g)	PIRIDOXINA TOTAL (mg/100 g)
Sta. Catarina	0,16	0,14
Paraná	0,12	0,12
Paraná	0,16	0,20
Paraná	0,13	0,11
Paraná	0,15	0,18
São Paulo	0,09	0,36
São Paulo	0,16	0,17
Minas Gerais	0,24	0,33

TABELA VI: TEORES DE ÁCIDO PANTOTÊNICO EM FARINHA DE  
MANDIOCA

PROCEDÊNCIA	ÁCIDO PANTOTÊNICO (mg/100 g)
Rio G. Sul	0,31
Sta. Catarina	0,28
Sta. Catarina	0,46
Sta. Catarina	0,26
São Paulo	0,26
Minas Gerais	0,26
Minas Gerais	0,50
Rio de Janeiro	0,33
Rio de Janeiro	0,36
Bahia	0,19
Piauí	0,29
Rio G. Norte	0,28
Ceará	0,33
Pará	0,31



#### IV -- CONCLUSÕES

Considerando-se o conteúdo das farinhas de mandioca em ácido nicotínico, os resultados obtidos foram em média de 0,49 mg%, com um valor mínimo de 0,41 mg% e máximo de 0,69 mg%.

Em relação à trigonelina, o valor médio situa-se em torno de 2,50 mg%, com teor mínimo de 0,86 mg% e máximo de 7,35 mg%.

A dosagem de piridoxina apresentou uma média de 0,06 mg%, sendo o teor mínimo de 0,03 mg% e o máximo de 0,09 mg%.

Para o ácido pantotênico, registrou-se a média de 0,32 mg%, com valores mínimos e máximos, oscilando entre 0,19 mg% e 0,50 mg%.

No que diz respeito ao conteúdo em vitaminas das farinhas de milho, foi verificado que os valores obtidos para o ácido nicotínico situam-se entre 0,20 mg% e 1,00 mg por cento, com média em torno de 0,64 mg%.

O teor de piridoxina oscila entre 11 mg% e 0,36 mg%, sendo a média 0,22 mg%.

Tanto o ácido pantotênico como trigonelina não foram detectados em farinha de milho.

## V - AGRADECIMENTOS

Desejamos expressar nosso agradecimento ao Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e à Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas, particularmente, ao seu ex-diretor Dr. Milton Giovannoni, bem como ao atual diretor, Dr. Anibal de Paiva Campello pelos recursos materiais e humanos que foram colocados à nossa disposição para o desenvolvimento de nosso trabalho de Tese.

Agradecemos de modo especial à Dra. Elma N.S. de Oliveira nossa orientadora, pela dedicação, estímulo e aguçado espírito crítico, que muito nos ajudou na realização deste trabalho.

Nossos agradecimentos à Dra. Glaci T. Zancan, coordenadora do curso de pós-graduação.

Ao Dr. Luiz José Bove Kesikowski, agradecemos de modo particular, pelo auxílio prestado na elaboração dos trabalhos estatísticos.

Às instituições que contribuíram para a execução de nosso trabalho: Conselho Nacional de Pesquisas, Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ... (CAPES), Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico .... FUNTEC) e Conselho de Pesquisas da U.F.Pr., os nossos agradecimentos.

A todos que, direta ou indiretamente, auxiliaram na execução de nosso trabalho, a nossa gratidão.

## VI -- BIBLIOGRAFIA

- 1 - ANDRIGUETTO, J. M. et al. Normas e padrões de alimentação. 9ª ed. Curitiba, UFPr, 1972, p.147.
- 2 - ARAUJO, A.R.P.& PORTELA, Z.. Teor de piridoxina e ácido nicotínico em feijões do nordeste brasileiro. An. Inst. Quím.Universidade Recife, 1(2): 149-60, 1965.
- 3 - ARAUJO, A.R.P., LINS M. & PORTELA, Z.. Teor de ácido nicotínico em várias amostras de café do Brasil. An.Inst. Quím.Univers.Recife, 1: 57, 1963
- 4 - ATKIN, L.et al. Yeast microbiological methods for determination of Vitamins/Piridoxine/.Anal.Chem., 15 (1-12) : 141-4, 1943.
- 5 - ATKIN, L. et al. Yeast microbiological methods of assay pantothenic acid. In: KAVANAGH, F. Analytical Microbiology New York. Academic Press, 1963. p.503.
- 6 - BALLABRIGA, A. 1951. In: TROWELL, H.C.& DAVES, J.N.P.KWASHIORKOR I) Nutritional background history, distribution and incidence.Brit.Med.J.2(4788): 796-8, 11 Oct.1952.
- 7 - BARBIROLI, G. Recerche con la termobilancia sulla trasformazioni della trigonellina in acido nicotinico nella tostura industriale del caffè. Rassegna Chim., 5: 216-9, Set. - Oct., 1964.

- 8 - BEERS, J.R.1967. In RIBEIRO, S. Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos. Instituto de Microbiologia da U.F.Rio de Janeiro. /Tese de Mestrado/, 1972. 75 p.
- 9 - BROCK, J.F.& AUTRET, M.-1952. In:TROWELL, H.N.P.Kwashior-kor. I) Nutritional background history, distribution, and incidence. Brit.Med.J.,2(4788):796-8, 11 Oct., 1952.
- 10 - CAMPOS, F.M.A. A presença do complexo vitamínico B na raiz tuberosa da mandioca. An.Fac.Med.São Paulo,11:27, 1935.
- 11 - CARVALHO, M.et al. Distrofia pluricarencial hidropigênica. J.Pediat., 11:(11-12):15-59, 1945.
- 12 - CARVALHO, M.& POTSCH, N.Sobre o tratamento da distrofia pluricarencial hidropigênica. J.Pediat.,14(2):18-36, 1948.
- 13 - CARVALHO, A. Variability of the niacin content in coffe. Nature, 194:1096, 1962.
- 14 - CASCUDO, L.C. História da Alimentação no Brasil, São Paulo Editora Nacional, 1967, coleção Brasileira, p.93-223.
- 15 - CASTRO, J. & PECHNIK, E.. Valor nutritivo da mistura de milho com leite. Trabalhos e Pesquisas, Rio de Janeiro,

Instituto de Nutrição, Universidade do Brasil, 4: 11-27, 1951.

- 16 - CASTRO, J. Geografia da Fome, Rio de Janeiro, Livraria Editora da Casa do Estudante do Brasil, 1955, p.31-231.
- 17 - CONN, E.E.& STUMPE, P.K. Outlines of Biochemistry. 2 nd., New York, John Weley & Sons, 1967, p.154-191.
- 18 - DEULOFEU, V.et al. Química Biológica, 9ª ed.Buenos Aires, Ateneu, 1967, p.1027-1080.
- 19 - FOA, P.P.& GLICKSMAN, A.S. On the excretion of nicotinic acid following a test dose of trigonelline. Arch.Bioch. 11:477. 1946.
- 20 - FRAGA, C. Jr.Malnutrition induced by disease. Hospital. 69:653-67, abril, 1966.
- 21 - FRANCO, G. Teor vitamínico dos alimentos, Rio de Janeiro, José Olímpio, 1968, p.3-141.
- 22 - FRONTALI, G.1946. In: TROWELL, H.C.& DAVES, J.N.P.Kwashior kor. I) Nutritional background history, distribution, and incidence. Brit.Med.J.,2(4788):796-8. Oct., 1952.
- 23 - FRONTALI, G.1952. In: TROWELL, H.C. Clinical aspects of the treatment of Kwashiorkor. Ann.N.Y.Acad., Sci. 57:

722-33, 1952.

- 24 - GORTER, K. 1910. In: MORRES, R.G.& GRENINGER, D.M. Anal. Chem., 23:327-331, 1951.
- 25 - GRANER, E.A. et al. A mandioca e seu valor nutritivo. Hospital, 26:879-94, 1944.
- 26 - GRAVIOTTO, R.O., GUSMAN, J.G.& SUARES, S.M.L. Incremento del contenido de niacina (vitamina antipelagrosa) durante la torrefaccion del cafe y su significado en el aporte de esta vitamina a la dieta. Ciencia, 15:24, 1955.
- 27 - GUERNELLI, O. Estudo sobre as possibilidades de enriquecimento da farinha de mandioca. Trabalhos e Pesquisas, Inst.de Nutr.Univers.do Brasil, 5:73-107, 1952.
- 28 - HARPER, H.A. Manual de Química Fisiológica. São Paulo, Atheneu, 1968, p.85-124.
- 29 - HUGLES, E.B.& SMITH, R.F. The nicotinic acid content of coffes. J.Soc.Chem.Ind., 65:284, 1946.
- 30 - ISBELL, H. The use of charcoal treated peptone in microbiological assays. Science, 102:671, 1945.
- 31 - JOSHI, J.G.& HANDLER, P. Metabolism of trigonelline. J. Biol.Chem., 237:3185-8, 1962.

- 32 - KIZAWA, K. Estudo comparativo entre dois métodos microbio-  
lógicos para a dosagem do ácido nicotínico. Instituto de  
Bioquímica da U.F.Pr., Curitiba, 1969/Tese de Mestrado/  
p.16.
- 33 - KREHL, W.A. et al. In: FOA, P.P. & GLECKERMANN, A.S. On the  
excretion of nicotinic acid following a test dose of  
trigonelline. Arch Bioch., 11:477, 1946.
- 34 - LOBATO, I.F. Alimentação e Saúde. Rio de Janeiro, Victor  
Publicações, 1967. P.161-8.
- 35 - MAHLER, H.R. & CORDES, E.H. Biological Chemistry. New York,  
Harper & Row, 1963. P.377-430.
- 36 - MARQUES, N.A. & BALASSIANO, B.G. Kwashiorkor - Estudo de  
47 casos na quinta enfermagem do Instituto Fernandes Fi-  
gueira. Hospital, 69(1):155-83, 1966.
- 37 - MEDER, H. & WISS, Occurrence in foods. In: SEBRELL, W.H. &  
HARRIS, R.S. The Vitamins. New York, Academic Press, 1967  
p.21-9.
- 38 - MEIKLEJOHN, A.P. & PASSMORE, R. 1951. In: TROWELL, H.C. & DA-  
VES, J.N.P. Kwashiorkor. I) Nutritional background his-  
tory, distribution, and incidence. Brit.Med.J. 2 (4788)  
796-8, 11 Oct., 1952.

- 39 - MOORES, R.G. & GRENINGER, D.M. Determination of trigonelli  
ne in coffe. Anal.Chem., 23: 327, 1951.
- 40 - MOYER, A.W.& DU VIGNEAUD, V. The structural especificity  
of choline and betaine in transmetylation. J.Biol.Chem.,  
143:373-83, 1942.
- 41 - OGINSKY, E.L.& UMBREIT, W.W.- An Introduction to Bacterial  
Physiology. San Francisco, W.H. Freeman and Company, 2<sup>a</sup>  
ed., 1959. p.11.
- 42 - OLIVEIRA, E.N.S., CAMPOS, B.& KIZAWA, K. Teor de ácido ni  
cotínico no café brasileiro. Rev.Inst.Biol.Pesq.Tecnol.  
15:11-13, 1970.
- 43 - OLIVEIRA, E.N.S., CAMPOS, B.& KIZAWA, K. Teor de Trigoneli  
na no café brasileiro. Rev.Inst.Pesq.Tecnol. 15:14-15,  
1970.
- 44 - PAULA, A. Na alimentação o futuro do Brasil. Rio de Janei  
ro. Gráfica "O Cruzeiro", 1950, p.81.
- 45 - PERNETTA, C. Terapêutica Infantil. Rio de Janeiro. Editó-  
ra Guanabara Koogan, 1959, p.83-93.
- 46 - PINHEIRO, P.A. Modificação do Método para determinação de  
vitamina B<sub>6</sub> com Saccharomices carlsbergensis ATCC "9080  
/Tese em preparação .



- 47 - POLSTORFF, K. & GORTER, O. 1909. In: MOORES, R.& GRENINGER, D.M. Determination of trigoneline in coffee. Anal. Chem. 23:327, 1951.
- 48 - PORTO, J.A. et al. Kwashiorkor. Caso observado em adulto. Hospital, 59(2):301-7, Fev., 1961.
- 49 - PUGL, E.L. & WAKIL, S.J. - Studies on the meckanism of fatty acid syntesis. J.Biol.Chem., 240:4727, 1965.
- 50 - RIBEIRO, S. Dosagens microbiológicas de vitaminas em peixes e crustáceos. Instituto de Microbiologia da U.F.Rio de Janeiro. /Tese de Mestrado/, 1972. 75 p.
- 51 - RIBODEAU-DUMAS, L.et al. 1927. In: TROWELL, H.C.& DAVES, J.P.N.Kwashiorkor. I) Nutritional background history, distribution, and incidence. Brit.Med.J., 2 (4788): 796-8, 11 Oct., 1952.
- 52 - ROBINSON, F.A. The vitamins co-factors of enzyme systems. London, Pergamon Press, 1966. p.234-475.
- 53 - SEBRELL, W.H.Jr.& HARRIS, R.S. Vitamin B<sub>6</sub> group The vitamins. New York. Academic Press, 1967. p.2-90.
- 54 - SEBRELL, W.H.Jr.& HARRIS, R.S. The Vitamins. New York, Academic Press, 1967. p.422.

- 55 - STARE, F.J. Amino acid feeding in Kwashiorkor. Nutr.Rev.,  
15 (5):13-22, May 1957.
- 56 - THERON, J.J. et al. The state of pyridoxine nutrition in  
patients with Kwashiorkor. J.Pediat., 59: 439, 1961.
- 57 - TROWELL, H.C. Clinical aspects of the treatment of Kwashi  
orkor. Ann.N.Y.Acad.Sci., 57(6):722-33, 1952.
- 58 - TROWELL, H.C. & DAVES, J.N.P. Kwashiorkor. I) Nutritional  
background history, distribution, and incidence. Brit.  
Med.J., 2(4788):796-8, 11 Oct., 1952.
- 59 - WILLIAMS, C.1935. In CARDIACOS, A.G. Les manifestations cu  
tanees du Kwashiorkor. Arch.Frac.Pediat., 18:263-6, Feb  
1961.
- 60 - WILLIAMS, W.L. Yeast microbiological method for determina  
tion of nicotinic acid. J.Biol.Chem., 166:397-406, 1946.